

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005803

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-104702
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 4 7 0 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 1 0 4 7 0 2
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 東レ株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



| | |
|-----------|--------------------------------------|
| 【書類名】 | 特許願 |
| 【整理番号】 | 66M00220-A |
| 【提出日】 | 平成16年 3月31日 |
| 【あて先】 | 特許庁長官殿 |
| 【国際特許分類】 | G01N 33/00 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘2-30-2 |
| 【氏名】 | 谷澤 克行 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 大阪府吹田市上山田7-C-104 |
| 【氏名】 | 黒田 俊一 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内 |
| 【氏名】 | 鄭 基晩 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内 |
| 【氏名】 | 秋山 英雄 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社 基礎研究所先端融合研究所内 |
| 【氏名】 | 信正 均 |
| 【特許出願人】 | |
| 【識別番号】 | 000003159 |
| 【住所又は居所】 | 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 |
| 【氏名又は名称】 | 東レ株式会社 |
| 【代表者】 | 榊原 定征 |
| 【電話番号】 | 047-350-6016 |
| 【手数料の表示】 | |
| 【予納台帳番号】 | 005186 |
| 【納付金額】 | 21,000円 |
| 【提出物件の目録】 | |
| 【物件名】 | 特許請求の範囲 1 |
| 【物件名】 | 明細書 1 |
| 【物件名】 | 図面 1 |
| 【物件名】 | 要約書 1 |

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

脂質 2 重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に特定の物質認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 2】

真核細胞由来の脂質 2 重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に特定の物質認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 3】

真核細胞が酵母である請求項 2 に記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 4】

真核細胞が動物または昆虫細胞である請求項 2 に記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 5】

粒子を形成する能力を有するタンパク質がウィルスの表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 6】

粒子を形成する能力を有するタンパク質が B 型肝炎ウィルスの表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 7】

前記物質認識分子が細胞機能調節分子であることを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 8】

物質認識分子が抗原、または抗体、または抗体の一部、または抗体類似体であることを特徴とする 1 ないし 6 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 9】

物質認識分子がリガンド物質と結合する細胞表面あるいは細胞内のレセプタータンパク質、または変異体、またはその一部、またはそれに結合する物質であることを特徴とする 1 ないし 6 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 10】

物質認識分子が酵素、またはその変異体、またはその一部、またはそれに結合する物質であることを特徴とする 1 ないし 6 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 11】

蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素を持つタンパク質及びタンパク質誘導体及び化合物を中空ナノ粒子の物質認識分子に導入、または中空ナノ粒子に内包させたことを特徴とする請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 12】

前記中空ナノ粒子を基板上に広げて形成された平面膜状生体認識分子整列体を用いることを特徴とする請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【請求項 13】

請求項 1 ないし 12 のいずれかの中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールを用いることを特徴とする物質のセンシング方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】中空ナノ粒子を用いたセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法

【技術分野】

【0001】

本出願の発明は、脂質膜と粒子形成能を有するタンパク質を含み、中空構造であることを特徴とする、直径がナノサイズの粒子を用いた物質のセンシングツールおよび検出方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、特定の分子を標識またはその分子だけが持つ特異的な活性を利用しその分子を他と区別して選択的にセンシングする研究が盛んに行われている。特に、生体内や環境中に極微量に存在するタンパク質や核酸あるいは化合物等を特異的かつ高感度にセンシングすることは疾患の早期診断や環境ホルモンの計測など医学や環境・生命科学分野において切実に要求されており、物質の特異的標識方法や測定感度向上のための研究が盛んに行われている。微量物質の高感度センシング方法としては大別すると、目的とする物質を蛍光や発光などで標識してセンシングする方法、あるいは物質との結合を高感度に感知する表面プラズモン共鳴法（SPR：Surface Plasmon Resonance）や水晶振動子法（QCM：Quartz Crystal Microbalance）等によるセンシング方法があり、これらの手法を用いることでngからpg単位のタンパク質等のセンシングが可能である。蛍光や発光などの標識によるセンシング法は、検出したい物質を蛍光または発光などの強い信号を発する物質（例えば、緑色発光タンパク質であるgreen fluorescent proteinや発光酵素であるluciferase等）で特異的に標識し、その標識物質をセンシングすることで感度を向上させる方法である（非特許文献1参照）。SPRは金属（誘導体）界面に局在しながら界面に沿って伝搬する電磁波である表面プラズモンを利用し、物質が結合したときの金属表面での電荷密度波の変化を測定することで物質の結合力や量を測定する方法である（非特許文献2、3参照）。QCMは電極上に吸着した質量に比例して基本振動数が減少することを利用し、ナノグラムレベルで物質の結合量や結合と解離の速度が測定できる方法である（非特許文献3、4参照）。

【0003】

一方、タンパク質等を細胞や粒子の表面に提示させることで、物質のセンシングや効率的生産または薬物の臓器特異的運搬などに応用する研究が近年盛んに行われている。具体的には、酵母などの生細胞やウイルスの表面に機能を持つタンパク質やペプチドなどを提示させる手法、或いは脂質やポリマー、または金属などの粒子の表面に物質を結合または提示させる方法が知られる（非特許文献5－10、特許文献1、2参照）。

【非特許文献1】大島ら 著、ホストシーケンスタンパク質実験法2、東京化学同人、2002年、p130－146

【非特許文献2】岡本隆之・山口一郎 著、表面プラズモン共鳴とそのレーザー顕微鏡への応用、レーザー研究、レーザー学会、1996年、24巻、10号、p1051－1053

【非特許文献3】大島ら 著、ホストシーケンスタンパク質実験法3、東京化学同人、2002年、p115－137

【非特許文献4】岡畑恵雄・古沢宏幸 著、先端化学シリーズIII、丸善株式会社、2003年、p67－73

【非特許文献5】Szardenings M、J. Recept Signal Transduct Res.、（スザーデニング、レセプトシグナルトランスダクトリサーチ）2003年、23、p307－49

【非特許文献6】植田充美、バイオサイエンスとインダストリー、（財）バイオインダストリー協会、1997年、55、p253－254

【非特許文献7】植田充美・村井稔幸、生物工学、日本生物工学会、1998年、76、p506-510

【非特許文献8】Shindo M. et al.、Ann. Intern. Med.、(シンドラ、アナルインターナルメディシン) 122、586-591 (1995)

【非特許文献9】Kamps J A.、Biochim. Biophys. Acta.、(カンパス、バイオケミカルバイオフィジクスアクタ) 1278 (2)、183-190 (1996)

【非特許文献10】US FDA License 0043、Abbott Laboratories (US FDAライセンス0043、アボットラボラトリーズ)

【特許文献1】特開2001-316298号公報

【特許文献2】特表2003-504506号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、生体内や環境中にはpg以下の超微量で存在しながらも非常に重要な生理活性を持つ分子が数多く存在する。これらの超微量に存在する分子は上記に代表されるセンシング方法だけでは測定が困難であるため、濃縮や精製等によるセンシング信号の増幅工程が必要とされるが、これらの工程は煩雑であり、さらに濃縮・精製時における装置への非特異的な吸着などによるサンプルの損失やサンプル中に大量に存在する分子によるマスキング効果などにより、特に目的とする物質のサンプル中の含有量が微量であるほどそのセンシングは困難となる。そのため、このような工程を行わずに効率的に検出信号を増幅できる方法の確立が待たれている。加えて、この増幅技術が従来のセンシング技術(SPR、QCM等)と容易に併用可能であればなお望ましく、それにより従来のセンシング法の感度向上につながる。また、検出信号の増幅技術は、DNAチップやプロテインチップに代表されるバイオチップのように、微量のサンプルを用いて定量的かつ高感度なセンシングが求められる場合においては必要不可欠な技術として求められている。

【0005】

このような物質のセンシング感度向上の課題を解決する有効な方法として、センシングが容易な構造体の表面に、目的の物質を特異的に感知する物質認識分子を提示させ、目的分子と結合した該構造体をセンシングすることでセンシングの信号を増幅させることが考えられる。センシングが容易な構造体としては酵母などの生細胞やウイルス、ポリマーあるいは金属等からなる粒子体等が考えられる。生細胞やウイルスは、遺伝子工学的手法などを用いて膜表面に物質認識分子を整列化させて提示できる反面、その利用に際して感染や環境への影響等、安全性の面から制限が多い。また、ポリマーや金属からなる粒子の場合は感染や環境への影響は少ないが、粒子の表面への物質認識分子の提示を電荷もしくは化学的な結合に依存するため、物質認識分子の活性部位を一方方向に整列化させることは困難であり、かつ反応過程での物質認識分子の構造変化(失活)が起こる可能性が高い。特にポリマーや金属を使う場合には自家蛍光を発する材料が多く、光学検出器を使った蛍光や発光等のセンシングにおいて高いバックグラウンドを生じやすい点からも、材料選択において制限が多い。

【0006】

さらに上記細胞や粒子によるセンシング技術における課題は、特異性の増強である。すなわち、目的以外の物質が表面(特に細胞壁)の構造やポリマーや金属の表面に非特異的に結合し、高いバックグラウンドを生じやすい。このような非特異的な結合を低減させるためには、目的物質と結合する反応部位以外を脂質などで被覆することなどが考えられ、効率的な被覆技術の確立が必須となっている。例えば、人工的、または生物由来の脂質膜からなる粒子を使うことで回避できると考えられるが、人工的な脂質粒子(リボソーム)は不安定であり、また大きさや物質認識分子の提示量・整列化等において再現性が低い。

【0007】

それに対して、ウィルスの表面抗原タンパク質を発現できる遺伝子組換え細胞から産生される中空ナノ粒子は上記課題を全て解決できる。すなわち、該中空ナノ粒子はウィルスとしての生活環を持たないため安全であり、かつ生体膜成分を含んでいるため粒子表面への非特異的な物質の結合が抑制できる。さらに表面抗原タンパク質が脂質2重膜の中で整列されていることを利用して遺伝子工学的に粒子表面に物質認識分子を提示できること、自家蛍光がないこと、しかも該粒子は物理的にも非常に安定で、8Mのウレア存在下でもその形態を維持できることなどの特徴をもつ（特開2001-316298号公報参照）。

【0008】

しかし、現在までに該粒子を用いたセンシングの信号・感度増幅のための応用例はなく、該粒子を検出することでウィルス感染の有無を特定する、あるいは臓器特異的に薬物を輸送するためのDDS研究などに使われているのみである。そこで、この出願の発明は、かかる現状を鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、目的とする物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を高精度、かつ高感度にセンシングできる汎用的なツールおよびこれらを用いたセンシング方法を提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

この出願の発明は、上記の課題を解決するため、まず第1に、脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に特定の物質認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールを提供する。第2に、この出願の発明は、真核細胞由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に特定の物質認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールを提供する。第3に、この出願の発明は、真核細胞が酵母であること、および第4に、真核細胞が動物または昆虫細胞である請求項2の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールを提供する。また第5に、この出願の発明は、粒子を形成する能力を有するタンパク質がウィルスの表面抗原タンパク質であること、および第6に粒子を形成する能力を有するタンパク質がB型肝炎ウィルスの表面抗原タンパク質であることを特徴とする前記いずれかの中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールを提供する。この出願の発明は、また、第7に、前記物質認識分子が細胞機能調節分子であること、第8に、物質認識分子が抗原、または抗体、または抗体の一部、または抗体類似体であること、第9に、物質認識分子がリガンド物質と結合する細胞表面あるいは細胞内のレセプタータンパク質、または変異体、またはその一部、またはそれに結合する物質であること、第10に、物質認識分子が酵素、またはその変異体、またはその一部、またはそれに結合する物質であることを特徴とする前記いずれかの中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールを提供する。第11に、この出願の発明は、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素を持つタンパク質及びタンパク質誘導体及び化合物を中空ナノ粒子の物質認識分子に導入、または中空ナノ粒子に内包させたことを特徴とする物質のセンシングツールも提供する。さらに、この出願の発明は、第12に、前記いずれかの中空ナノ粒子を基板上に広げて形成された平面膜状生体認識分子整列体を用いた物質のセンシングツールを提供する。この出願の発明は第13に、前記1ないし12のいずれかのセンシングツールを用いることを特徴とする物質のセンシング方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

この発明によって、物質認識分子を提示した中空ナノ粒子を利用した、生体または環境中の極微量成分を効率的にセンシングするための汎用的なツールおよびこれらを用いたセンシング方法が提供される。この方法はセンシング可能な分子を表面に提示した中空ナノ粒子を利用することにより、目的とする物質のセンシング感度を著しく向上させることより成し遂げられ、夜中の野原に刺さった鉄釘を探す方法として明るく光る風船の下に磁石を付けて野原を漂わせることに例えられる。本粒子は菌体やウィルスを使う表層提示に比べて、生細胞を使用しない点において極めて安全であること、該中空ナノ粒子が生体膜を

含んでいるため粒子表面への非特異的な物質の結合も抑制できること、物質認識分子を脂質2重膜上に整列化させて提示できること、自家蛍光もないこと、物理的に非常に安定であること等の特徴をもつ。しかも、SPRやQCM等の現存の物質測定技術にそのまま応用でき、かつ大量発現系を用いて生産することができることから、産業上の利用性も高い。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において「脂質2重膜」とは5～20nmの厚さで2枚の脂質の層からなっており、それぞれの層の中で、両親媒性脂質の極性の頭が親水系の溶媒と接触しており、非極性の炭化水素の部分が2重層の内部を向いているものをいう。脂質2重膜の例としては、細胞膜や核膜、小胞体膜、ゴルジ体膜、液胞膜のような生細胞における生体膜、または人工的に作製したリボソーム等が挙げられる。本発明において「認識する」とはある2つ以上の物質がお互いの構造あるいは性質によって特異的に結合することを意味する。この結合は共有結合、イオン結合、疎水結合、水素結合、金属結合等のあらゆる分子間相互作用によって成し遂げられ、例え認識される相手の物質が夾雑物の中にあっても特異的に行われるものである。本発明において「導入されている」とは物質認識分子が遺伝子工学的手法により、粒子を形成する能力を有するタンパク質に共有的に融合されている、つまり物質認識分子と粒子を形成する能力を有するタンパク質が融合タンパク質として細胞の中で発現された状態で粒子を形成していること、または物質認識分子が粒子を形成する能力を有するタンパク質に物理的、あるいは化学的な修飾や吸着等の方法で結合されていることをいう。本発明において「中空ナノ粒子」とはナノサイズの粒子、特に20～500nmの直径を持つ粒子であり、粒子の内部には様々な物質（例えば、蛍光色素やタンパク質、核酸、化合物等）が入れられる空間がある粒子をいう。その空間は必ずしも気体系の空間ではなく、むしろ内部に入る物質が安定に維持できる溶液系の空間である。

【0012】

本発明において「リガンド物質」とは、ホルモン（生物個体中のある部位の細胞が、別の部位の細胞と連絡するための分子）や増殖因子（細胞増殖を制御する物質）、神経伝達物質（シナプスで神経情報を伝達する物質）のように対応するレセプターと結合して、細胞内または細胞間の情報伝達に関わる物質を意味し、ペプチドやタンパク質あるいはステロイド性、または低分子化合物からなる。これらのリガンド物質は生細胞から精製する方法、遺伝子組み替えによってリガンド物質を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法や化学合成によって得られる。本発明において「細胞表面」とは細胞壁、または細胞膜の中、あるいはその表面を意味する。また「細胞内」とは細胞膜によって包まれている全ての部分を意味する。また「レセプタータンパク質」とはリガンド物質と結合し、細胞内または細胞間の情報伝達に関わる一連のタンパク質群を意味し、その例としては、例えば、グアニンヌクレオチド結合タンパク質や核内受容体の様に細胞膜や細胞内に存在しながらホルモン等のリガンド物質と結合して、その信号を細胞外から細胞内へ、あるいは細胞質から核に伝えるタンパク質群やリガンド物質として増殖因子が結合する、レセプターチロシンキナーゼ、またはアドレナリン受容体のような神経伝達物質を認識してその信号を伝えるタンパク質群等がある。本発明において「レセプタータンパク質」は上記以外にも細胞の各膜内に存在しながら金属イオン等の能動輸送に関わるタンパク質群も含む。

【0013】

本発明において「酵素」とは細胞の内外で核酸や糖、脂質、あるいは他のタンパク質を修飾、切断、融合、変成、結合させることで細胞の生命現象を司る一連のタンパク質群であり、例えば、プロテアーゼやリン酸・糖鎖修飾酵素、核酸切断（制限）酵素、糖・脂質分解酵素、核酸・タンパク質・糖・脂質の生合成酵素等が挙げられ、またそれ自体では活性がないが、他の酵素の活性を助ける補酵素もその意の中に入る。

【0014】

本発明においてレセプタータンパク質や酵素の「変異体」とはこれらタンパク質に遺伝子工学的に点、あるいは複数の変異を起こしたもの、またはタンパク質の全長から一部を削り取るか、新しくタンパク質配列を付け加えたもの、さらには核酸・糖・脂質・化合物等によってタンパク質の一部に修飾を施したものであって変異を起こす前のレセプタータンパク質や酵素が物質認識分子として認識する目的分子と同一のもの認識する活性を持つものまでを含む。該変異体がタンパク質に遺伝子工学的に点、あるいは複数の変異を起こしたもの、またはタンパク質の全長から一部を削り取るか、新しくタンパク質配列を付け加えたものであるならば、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を持つ変異体が好ましく用いられる。このような変異体を作製するには該タンパク質を発現する遺伝子を含む環状プラスミド上でアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を行うためのプライマーとQuickChange site-directed mutagenesis kit、またはQuickChange multi site-directed mutagenesis kit、またはQuickChange XL site-directed mutagenesis kit (STRATAGENE社) 等の変異を起こすためのキットを用いて12~18サイクルのPCRを行い、その産物を制限酵素DpnIで切断し、大腸菌に形質転換することにより可能である。また、核酸・糖・脂質・化合物等によってタンパク質の一部に修飾を施したものとして具体的にはリン酸か酵素によるタンパク質中のセリン、またはスレオニン残基のリン酸化、糖鎖付加酵素によるアスパラギン、またはセリン、またはスレオニン残基の糖鎖付加、または還元・アルキル試薬によるシステイン残基の還元・アルキル化のようなものを例示することができ、これらのものを作製するにはタンパク質にリン酸、または糖鎖等を混ぜて、リン酸か酵素や糖鎖付加酵素を加え、その酵素が働く最適な条件(温度、pH、塩濃度等)を維持したり、タンパク質の入った溶液に還元剤であるジチオソレイトールやメルカプトエタノール等を終濃度で5mM濃度になるように入れ、温度60℃付近、pH中性以上で1時間反応させ、更にアルキル化剤として5~15mM濃度のヨードアセトアミドを加え室温で1時間以上反応させることにより可能である。もちろん例示した上記の修飾以外にもタンパク質に対する様々な修飾が考えられることは言うまでもない。

【0015】

また、本発明においてレセプタータンパク質や酵素の「一部」とは、これらタンパク質が持つ特性を完全に、あるいは部分的に生かせる一部分の配列(少なくとも5個以上のアミノ酸が連続して一致する配列)を遺伝子工学的、あるいはタンパク工学的に取り出すか、合成したものであってレセプタータンパク質や酵素全体が認識する目的物質と同一のものを認識できる活性を有するものを意味する。

【0016】

また、本発明においてレセプタータンパク質や酵素に「結合する物質」とは細胞内でこれらのタンパク質と常に結合して存在するか、あるいは結合することで、その構造を維持する、またはその活性を助けるか補う役割をする物質のことを指し、例えば、核内受容体における分子シャペロンタンパク質や酵素の活性を助ける金属イオンなどの補酵素、あるいはレセプターや酵素の細胞内の特定場所への正しい運搬や膜結合型レセプタータンパク質・酵素の膜への固定の役割を担う一連の膜タンパク質群等がこれに当てはまる。本発明において「蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元を持つタンパク質、またはタンパク質誘導体」とは緑色蛍光タンパク質やその変異体のようにタンパク質そのものがある波長の光を受けて蛍光を発するものやタンパク質に化学修飾法を使って蛍光を発する化合物を結合させた状態のタンパク質、またはluciferaseのようにエネルギーを使って光を発するタンパク質やそのようなタンパク質が結合しているタンパク質、またはヘムタンパク質のように特定の波長に対して強い吸収を有するタンパク質や光吸収能を持つ化合物、あるいはペプチド、あるいはタンパク質を結合させたタンパク質、または放射線同位元素である H^3 や P^{32} 等をタンパク質発現時の培地に加えるか、化学修飾によって標識したタンパク質のことであり、また、これらタンパク質の誘導体として、タンパク質の一部分を遺伝子工学的手法やタンパク工学的手法を用いて切り取って、他の分子、つ

まり核酸や糖鎖、脂質、他のタンパク質、または化合物と共有結合させたものを指し、また、タンパク質に化学修飾法や酵素等を使って、化合物を共有結合させたもの、糖鎖や核酸、脂質等を修飾したものも含む。この際、蛍光、発光、吸光、または放射線同位元素はタンパク質本体ではなく、タンパク質誘導体としてタンパク質に結合している核酸、糖鎖、脂質等に標識された状態でも良い。本発明において「基板」とは金属、プラスチック、有機・無機高分子材料であれば特に限定されないが、例えば金、銀、銅、ニッケル、コバルトやポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、セルロース、シリコン、マイカー等を用いることが好ましい。また、その表面の全体、または少なくともセンシングが行われる部分がこれらによって覆われているものが好ましい。

【0017】

本発明において「平面膜状生体認識分子整列体」とは本発明が定義している中空ナノ粒子を基板に結合させ、基板を粒子で覆った状態のものを意味しており、その作製は基板としてシリコン、マイカー、金属、プラスチック等を用い、その表面に中空ナノ粒子を物理的に吸着させる方法や基板に前もって本中空ナノ粒子が特異的に結合するタンパク質やペプチド、核酸、糖鎖、脂質、金属等で修飾を施すことで中空ナノ粒子表面のタンパク質や脂質または糖鎖等と基板が特異的に結合できるようにした方法などが考えられる。本発明の「平面膜状生体認識分子整列体」において、中空ナノ粒子は目的の応じて、粒子状のまま基板に結合させるか、あるいは粒子を基板と結合させた後に乾燥や超音波処理、電気ショック等の方法で粒子を破壊し、平膜状の膜にして基板に結合させることができ、従って、「平面膜状生体認識分子整列体」の厚さは5 nm～500 nmのものである。

【0018】

この出願の発明の、脂質とタンパク質を含みかつ中空構造をもつナノ粒子を含む微量物質のセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法は、粒子形成能を有するタンパク質に物質認識分子を導入することによって、そのセンシング信号を著しく増幅させ、かつ目的とする種々の分子を特異的に認識するもので、それによって今までセンシングが困難または不可能であった生体または環境中の微量成分をもセンシング可能にするものである。

【0019】

ここで「センシングツール」とは基板上に目的物質を固定させ、それを認識する物質認識分子を含む該中空ナノ粒子を結合させる、または基板上に該粒子を「平面膜状生体認識分子整列体」として固定させ、目的物質を結合させる、または、溶液中、あるいは基板上に該粒子を固定した状態で、目的物質を結合させた後、更に目的物質を認識する別の物質認識分子を含む該粒子を反応させる、サンドイッチ方式によって目的物質をセンシングするための手段である。本発明に係る物質のセンシングツールにおける中空ナノ粒子は図1に例示するように、細胞内でタンパク質を高発現可能なプロモータ配列を持ち、その下流にタンパク質の開始コドンがあって、その直後にタンパク質を小胞体にするためのシグナルタンパク質の配列と粒子を形成する能力を有するタンパク質の配列が連結されており、シグナルタンパク質配列と粒子を形成する能力を有するタンパク質配列の間、または粒子を形成する能力を有するタンパク質配列の内部、または下流に物質認識分子の配列が導入されている発現ベクターを作製し、それを細胞に形質転換して該中空ナノ粒子の発現誘導後、精製することによって作ることができる。酵母を用いた中空ナノ粒子の発現・精製を実施例1と2において例示する。

【0020】

この中空ナノ粒子を用いた本発明に係る物質のセンシングツールは、センシングのターゲットとなる物質を含む試料を結合させるための「基板」と、基板上に結合した試料からセンシングのターゲット物質を特異的にセンシングし、かつ、センシングした信号を増幅するための、ターゲット物質を特異的に認識できる物質認識分子が導入されており、かつ、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内

包している「中空ナノ粒子」、そして中空粒子由来の蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素の量を検出できる「検出器」を組み合わせることで作ることができる。これらを用いたセンシングは、基板上に試料を結合させ、その上から中空ナノ粒子を反応させた後、センシングのターゲット物質と結合しなかった中空ナノ粒子を洗い流した後に基板上に残った（つまり、センシングのターゲット物質と特異的に結合した）中空ナノ粒子の発する蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素の量を検出器で検出することで成し遂げられる。ここで基板への試料の結合は試料を乾燥した粉の状態か、溶液中に懸濁、または溶解させて基板と反応させることで物理的な吸着を誘導する方法や基板を前もってセンシングのターゲット物質が特異的に結合するタンパク質やペプチド、核酸、糖鎖、脂質、金属、平面膜状生体認識分子整列体等で修飾しておき、センシングのターゲット物質を特異的に基板表面に結合させる方法がある。ここで基板とセンシングのターゲット物質、あるいはターゲット物質と中空ナノ粒子間の結合を促すために系を振動、または回転、または温度調節等が望ましいこともある。

【0021】

このセンシングツールの具体的な用途としては、ある疾患の患者の血液中に特異的に存在するタンパク質に対する抗体や抗体の一部を基板上に結合（更に好ましくは平面膜状生体認識分子整列体を用いて整列させた状態で結合）させ、患者の血液を基板に反応させることで、患者特有のタンパク質を基板上の抗体と結合・整列させた後、このタンパク質を特異的に認識する別の抗体が表面に導入されており、かつ、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内包する中空ナノ粒子を用いて基板に結合した患者特有のタンパク質を認識させることで、該タンパク質の存在、あるいは含有量を中空ナノ粒子由来の蛍光量を測定することで確認・定量することが可能になる。この物質のセンシングツールを用いたセンシングは、微量信号の増幅効果のため、特に患者特有のタンパク質が nmol 以下の極微量の場合その威力を発揮する。また、環境ホルモンの測定にも利用することができ、ダイオキシンを例に挙げると、哺乳類の体内におけるダイオキシンのレセプターである「AhR」タンパク質の全長あるいはダイオキシン結合部位のみをSPR用の金基板上に整列させた状態で結合させ、そこにダイオキシンの汚染が心配される土壌、河川水、母乳等から組精製した、あるいはそのままの試料を基板と反応させ、基板をダイオキシンを含まない緩衝液で洗浄後、ダイオキシン-AhR結合体に特異的に結合する核内タンパク質である「ARNT」、またはダイオキシンに対する抗体が表面に導入されている中空ナノ粒子を基板に反応させ、その表面プラズモンの変化から試料中のダイオキシンの存在有無、あるいはその量を定量することが可能である。本発明の物質のセンシングツールを用いた環境ホルモンの測定はSPR以外にも、QCMを用いる方法や、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、または内包する中空ナノ粒子を用いたセンシングの方法等も考えられる。この際、環境中のダイオキシンの量は非常に微量であり、一般的には定量のためには試料からダイオキシンを抽出して更に高度に濃縮するといった前処理の必要があり、数日から数週間という長い時間が必要であったが、本発明のセンシングツールにおける信号の増幅効果により、前処理無しでも、あるいはより簡単な前処理によって測定が可能になり、測定の時間も数時間から数日と短くなることが期待される。

【0022】

また、本発明に係る物質のセンシングツールの別の形態としては、センシングのターゲットであるタンパク質や核酸等を含む試料をSDS-PAGEやアガロースゲル等により電気泳動した後、PVDFやセルロース性の膜に電氣的または浸透圧で転写し、転写した膜をターゲット物質を特異的に認識できる物質認識分子が導入されており、かつ、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内包している中空ナノ粒子を含んだ緩衝液中で反応させて、中空ナノ粒子と膜上に転写されたターゲットタンパク質を結合させる。その後、結合していない中空ナノ粒子を中空ナノ粒子を含まない緩衝液で洗い流した後に膜上に残った中空ナノ粒子由来の蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素の量を検出するものもある。

粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。このとき、真核細胞としては、酵母や昆虫細胞等が適用できる。本発明において酵母や動物細胞、昆虫細胞とは遺伝子組み替えを行った酵母や動物細胞、昆虫細胞も含まれる。酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母で修飾されない糖鎖等の高次構造が可能である点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞系はバキュロウイルスを用いた系であり、ウイルス粒子の発現を伴うためタンパク質発現に際して細胞が死滅、或いは溶解しやすい。その結果、死滅細胞から遊離したプロテアーゼにより発現させたタンパク質が分解されるという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入するため、培地中に分泌されても精製が困難なケースが多い。しかし最近、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系や無血清培養試薬がInvitrogen社により市販されている。したがって、このような材料を利用することにより、精製が容易となり、かつ高次構造、糖鎖修飾が維持されたタンパク質粒子が得ることができる。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウイルス(Hepatitis B Virus: HBV)やC型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus)、Microvirus、phagevirus、adenovirus、hepatonavirus、Parbovirus、papovavirus、Retrovirus、Reovirus、Coronavirus、カイコ細胞質多角体病ウイルス(Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus)などの表面抗原、または多角体タンパク質等が例示される。発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で前記HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母小胞体由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している(J. Bio. Chem., Vol.267, No.3, 1992-1993, 1992)。このような粒子は、HBVゲノムやHBVタンパク質を全く含まないので、ウイルスとしては機能せず、人体への安全性は極めて高い。この出願の発明の脂質を含む中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面の粒子形性能を有するタンパク質を任意の物質認識分子に改変することで、種々の物質(核酸、タンパク質、ペプチド、および化合物等)を特異的に認識し、そのセンシング感度を著しく増幅することが可能となる。もちろん、粒子形性能を有するタンパク質は、前記のB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウイルス、菌類等に由来する天然タンパク質や遺伝子工学的に組み替えられたタンパク質、種々の合成タンパク質等が考慮される。粒子形成能を有するタンパク質に導入される物質認識分子としては、例えば、細胞機能調節分子が挙げられる。本発明において「細胞機能調節分子」とは細胞が生きる上で必要とする様々な生命現象を司る因子を意味しており、例えば、抗体や抗体類似体、種々の抗体に対する抗原物質、成長因子、サイトカイン、酵素、細胞表面や内部の種々のリガンド物質に対するレセプタータンパク質、生体ホルモンや環境ホルモン、シャペロンタンパク質、アミロイド形成タンパク質等が考えられる。実際に、物質認識分子として使われる際は、必ずしも例示した上記分子の全長である必要は無くその一部や誘導体でも構わない。これら物質認識分子は、その組成として、タンパク質やペプチド、核酸、糖鎖、脂質等とその誘導体として、例えば、糖鎖やリン酸、化合物等によって修飾を受けたタンパク質やペプチド、あるいは核酸等が考えられる。同様に糖や脂質にタンパク質、ペプチド、核酸等が修飾されているものも考えられる。本発明の「細胞機能調節分子」の取得方法としては生細胞から種々の精製

カラムを用いて精製する方法や遺伝子組み替えによって細胞機能調節分子を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法等が考えられる。遺伝子組み替え法を用いる際には精製を簡便にする目的にヒスタグなどのタグ物質を細胞機能調節分子に付加することも考えられる。タグを付加せずに簡単に細胞機能調節分子を発現・精製する方法としては、無細胞系の *pure system* (PGI社) を用いる方法もある。また、本発明の物質認識分子としての細胞機能調節分子がタンパク質では無い場合 (例えば、核酸やステロイド物質等) は生体内から精製するか、化学合成によって作製することも可能である。本発明において「抗体類似体」とは生体から作られる抗体以外で、抗原となる物質を特異的に認識できる生体由来または人工的な化合物を指し、例えば、抗体の抗原認識部位だけを遺伝子組み替えによって改変して得られる単鎖抗体 (*single chain antibody*) やアフィボディ (*affibody*)、またはDNA結合タンパク質が特異的に認識するDNA配列を含む核酸分子や核酸のある配列を特異的に認識するタンパク質、またはアミロイドのような繊維構造体を特異的に認識できるタンパク質あるいは化合物等が挙げられる。これらは、ターゲットとする物質 (タンパク質、核酸、化合物、細胞、あるいは組織等) に応じて適宜選択される。この抗体類似体の取得方法としては遺伝子組み替えによって抗体類似体を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法や抗体をタンパク質分解酵素等で切断し、その一部を精製して使う方法、また抗体類似体がタンパク質で無い場合は化学合成による合成等が考えられる。遺伝子組み替え法を用いる際には精製を簡便にする目的にヒスタグなどのタグ物質を抗体類似体に付加することも考えられる。タグを付加せずに簡単に抗体類似体を発現・精製する方法としては、無細胞系の *pure system* (PGI社) を用いる方法もある。もちろん本発明における「物質認識分子」は細胞機能調節分子に限るものではなく、センシングのターゲット物質と特異的に結合する能力を有するものであればその意を成すものである。

【0024】

また、本粒子を作製する際には目的に応じて様々な応用が考えられる。例えば、中空粒子内に蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元を発する物質をエレクトロポレーション、または超音波、または自然拡散法などの方法によって内包させることでセンシング信号の増幅も可能である。この際の「エレクトロポレーション」とは電気ショックによる物質の導入法であり、最良の条件は内包させる物質の性質や濃度等によって異なるが、一般的には $100\text{ ng} \sim 200\text{ mV} \sim 1000\text{ V}$ 程度の電圧を数m秒～数分間の処理で粒子に様々な物質を内包させることが可能である。超音波や自然拡散法による内包はナノ粒子と内包させたい物質を水または緩衝液中に共存させ、攪拌させるか整地する、あるいは超音波処理を $10 \sim 400$ ワットの強さで、 10 秒～ 2 時間の間処理することで成し遂げられる。また、粒子形成能を有するタンパク質の一部に目的物質の認識分子以外にも本粒子の精製のためのタグタンパク質やセンシングを容易にする目的で蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素を発する物質、さらには種々のセンシング基板 (SPR、QCMなど) を用いて物質を特異的にセンシングするときの基板) に固定させるための物質等を化学修飾法、または遺伝子工学的手法により一つのナノ粒子に複数の分子を同時に提示することが可能である。この粒子表面 (粒子の外または内側) への複数分子の提示は一つの発現ベクターではなく、それぞれ異なる分子を粒子形成能を有するタンパク質に導入した複数の発現ベクターを同時に一つの細胞で発現させることによって成し遂げられる。タンパク質を表層に提示させる技術は既にファージディスプレイ法や酵母の表層にタンパク質を提示する方法、抗体などをポリマーや金属製粒子の表面に結合させる方法 (Szardenings M, J. Recept Signal Transduct Res.、23、307-349、2003; 植田充美、バイオサイエンスとインダストリー、55、253-254、1997; 植田充美、村井稔幸、生物工学、76、506-510、1998) などが知られているが、安全性や粒子サイズまたは作製の容易さなどに問題があり、センシング系としての利用には制限がある。本出願のナノ粒子は精製され

たタンパク質粒子であるため感染性がなく、溶媒などの環境の変化に強い。また、その大きさは扱いやすいことから直径が10～500nmであり、より扱いやすいことから望ましくは50～200nmである。さらに、その応用としてシリコンなどの基板上への展開により発明者らの論文Anal. Biochem., Vol. 309, 196-119、

2002に示すように本発明のナノ粒子は平面膜構造になるため、粒子の表面提示タンパク質を脂質2重膜を介して基板上に整列化した「平面膜状生体認識分子整列体」を形成できる。同時に、この「平面膜状生体認識分子整列体」は脂質2重膜を基板に被覆することになり、目的以外のタンパク質等の基板への非特異的な吸着を防止する効果も期待できる。このように本発明の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールは、提示タンパク質の方向性を整列させる、あるいは、非特異的吸着を防止する目的で、中空ナノ粒子を基板上に展開して物質をセンシングさせることも可能である。さらに本発明の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールは、ELISA法でよく見られるサンドイッチ方式のセンシングツールとして、平面膜状生体認識分子整列体にセンシングのターゲットとなる物質を結合させた後、その上から更に別の中空ナノ粒子を用いてターゲット物質をセンシングすることで、基板への非特異的吸着を抑えながらターゲット物質のセンシング感度を向上させるといった応用も考えられる。このように本発明の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールは様々な応用により、従来の物質センシングツールでは得られなかった感度と特異性を得ることが可能になる。

【0025】

以上述べたように、この出願の発明の脂質とタンパク質を含み、中空構造であることを特徴とするナノ粒子を使った物質のセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法は、該粒子が物理的に非常に安定で、粒子の表面に脂質膜成分を含むことで流動性が生まれ、また物質の非特異的吸着を抑えることが可能である。しかも、細菌やウイルス等の表面にタンパクを提示する方法と比較し安全、かつ直径100nm前後の粒子であるため、SPR等の既存の物質センシング方法への応用も容易であり、微量のセンシング信号を効率的に増幅できることをその特徴とする。さらに、該ツールを用いることで、極微量に存在する分子をセンシングするときの信号を効率的に増幅することが可能となるため、プロテインチップ、医療における診断マーカーのセンシング・評価、環境物質測定、生化学の物質測定・分析等、生体や環境中の微量成分を簡易的、あるいは高感度でセンシングすることを目的とした様々な分野への応用が可能となる。以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【実施例】

【0026】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。以下の実施例においては、本発明の「中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール」として実施例1と3の金基板に結合させる中空ナノ粒子と金の基板を組み合わせたSPR装置や実施例2の抗ヒスチジナグが付いた96well plateとGFP粒子そして蛍光プレートリーダーを組み合わせた蛍光中空ナノ粒子の測定装置を使用している。以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウイルス表面抗原(Hepatitis B virus surface Antigen)を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図1の模式図のように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸(pre-S2 peptide)が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸(pre-S1 peptide)が付加したものである。HBsAg Lタンパク質のPre-S領域(pre-S1、pre-S2)は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を

持ち、p r e e S 2 は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。真核細胞でHB s A g を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HB s A g のLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。以下の実施例では、HB s A g のLタンパク質を用いた。図2に以下の実施例に記載されるHB s A g 粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

(実施例1)

(遺伝子組換え酵母によるHB s A g 粒子の発現)

発明者らによって報告されたJ. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992記載の方法に基づいて、pGLDLHP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母(Saccharomyces Cerevisiae AH22R⁻株)を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、HB s A g Lタンパク質粒子を発現させた。(図2a、b)定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent(Pierce Chemical Co.製)を用いて、whole cell extractを準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離して、銀染色とHB s タンパク質に対する抗体を用いたwestern blotting(1次抗体は、anti-HB s A g モノクローナル抗体)によって試料中のHB s A g タンパク質の同定を行なった。

(HB s A g 粒子の遺伝子組換え酵母からの精製)

(1)合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量26g)をbuffer A溶液(7.5M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.2、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween80)100mlに懸濁し、ガラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破砕した。破砕後、上清を遠心分離により回収した。(図2c、d)

(2)次に、上清を0.75倍容の33%(w/w)PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離(7000rpm、30分間)を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。(3)再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28,000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンブロット法(Western Blotting)によりHB s A g を含む画分を同定した。さらに、HB s A g を含む画分をTween80を含まないbuffer A溶液で透析した。(4)(3)で得られた透析液(12ml)を5~50%の勾配をかけたショ糖に重層し、28,000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後、(3)と同様に、HB s A g を含む画分を同定し、HB s A g を含む画分を尿素とTween80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した((2)~(4):図2e)。

(5)(4)と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター(Ultra Filter) Q2000(アドバンテック社製)を用いて濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。(図2f)CsCl平衡遠心分離後のウェスタンブロット(3)の結果から、HB s A g は、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることを確認した。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HB s A g 粒子を得た。一連の精製過程における画分を銀染色SDS-PAGEで解析した。また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5)で得られたHB s A g 粒子を37℃で12時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行い、銀染色により同定を行なった。その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

(ナノ粒子による表面プラズモン信号増幅)

上記の要領で酵母から精製したHB s A g 粒子を50mg/ml濃度で日本レーザ電子社のNanosensor用SPR測定チップ上に吸着させた。コントロールとして、牛血清アルブミン(BSA)タンパク質を同要領でチップ上に吸着させ、両タンパク質がS

P Rの金基板に結合した際の信号変化を計測した。その結果、図3で示すようにB S Aに比べて、H B s A g粒子のS P R信号は6倍以上であることが確認された。同要領でG F P、I g Gなど種々のタンパク質とのS P R信号を比較した結果、H B s A g粒子がS P R基板上に結合することで上記のタンパク質よりS P Rの信号が5～10倍以上増幅されることが確認された。これにより、本発明における粒子を使って物質センシングする方法はそのセンシング感度を劇的に向上可能であることが確認された。

(実施例2)

(遺伝子組換えによる物質認識タンパク質を融合したH B s A g L粒子の発現ベクター作製)

先ず、発明者らによって報告された特許公開2001-316298で記すように著者らの報告J. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992記載の方法に基づいて作製されたp G L D L I I P 39-R c TをQ u i c k C h a n g eTM S i t e-D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t (S t r a t a g e n e社)を用いたP C R法により改変し、ヒトの肝臓認識部位(3～77コーディング部位)を欠損させると同時に、制限酵素N o t Iサイト(g c g g c c g c)の配列を挿入した酵母発現ベクターp G L D L I I P 39-R c T n u l l(配列番号1と2を使用)上で、N o t I部位にP C Rで増幅させたN-末にヒスチジントグを持つG F Pを挿入したベクター、p G L D L I I P 39-R c T-G F Pを作製した(配列番号3と4を使用)(図4)。

(遺伝子組換え酵母による物質認識用タンパク質を融合したH B s A g L粒子の発現)

上記の酵母発現ベクターp G L D L I I P 39-R c T-G F Pを保持した遺伝子組換え酵母(S a c c h a r o m y c e s C e r e v i s i a e A H 22R⁻株)を、合成培地High-Piおよび8 S 5 N-P 400中で培養し、物質認識用タンパク質を融合したH B s A g Lのタンパク質粒子を発現させた。(図2a、b)定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Y e a s t P r o t e i n E x t r a c t i o n R e a g e n t (P i e r c e C h e m i c a l C o.製)を用いて、w h o l e c e l l e x t r a c tを準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S-P A G E)を用いて分離して、銀染色とヒスチジントグに対する抗体を用いたw e s t e r n b l o t t i n gによって試料中のH B s A g Lタンパク質に融合した物質認識用タンパク質の同定を行なった。p G L D L I I P 39-R c T-G F Pの酵母A H 22R株への形質転換は発明者らによって報告された特許公開2001-316298で記す方法に従った。これより、物質認識用タンパク質融合(G F Pの融合)H B s A g Lタンパク質の分子量が72 k D aのタンパク質であることが明らかとなった。

(H B s A g L粒子の遺伝子組換え酵母からの精製)

(1) 1 Lの合成培地8 S 5 N-P 400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量10 g)をb u f f e r A溶液(0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 7.2、15 mM E D T A、2 mM P M S F、0.1% T w e e n 80)100 mlに懸濁し、平均直径0.5 mmのガラスビーズを用いてビードビーター(B E A D-B E A T E R)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した(図2c、d)。(2)次に、上清をA m e r s h a m社のH i s T r a pカラム(1 ml)を用いて同社のタンパク質精製装置(A C T A p r i m e)にてヒスチジンとニッケル(N i²⁺)間のアフィニティーによる精製を行った。精製は60 mMのイミダゾールが入ったP B S (-)(第一製薬)緩衝液中でヒスチジントグをニッケルカラムに結合させ、同緩衝液20 mlで洗浄後、500 mMイミダゾールを含むP B S (-)緩衝液でニッケルに結合した粒子を抽出した。抽出したタンパク質は銀染色とヒスチジントグ抗体を用いたw e s t e r n b l o t t i n gによって精製度を確認した。(3)次に、分子量分画100 k D aの限外濾過膜(U l t r a F i l t e r ; Q 2000(アドバンテック社製))を用いて脱塩、濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。(4)G F Pが融合したH B s A g Lの精製粒子は510 nmの波長で強い緑色蛍光を発することを蛍光顕微鏡(O l y m p u s社、B X 51)にて確認した。(5)上記一連の精製操作により最終的に、培地1 L由来、湿重量10 gの

菌体から、約 2 m g の精製粒子を得た。

(G F P 融合粒子による抗ヒスチジントグ抗体のセンシング)

9 6 w e l l p l a t e に濃度を振った抗ヒスチジントグ抗体 (ナカライテスク、a n t i - H i s 6 m o n o c l o n a l) を 4 ℃ で 1 6 時間反応 (結合) させた後、0. 5 % の牛血清アルブミンによって室温、1 時間のブロッキングを行った。次に、上記実施例 C ~ E の要領で酵母から精製した G F P 融合粒子 200 m l (5 0 m g / m l 濃度) を加え、室温で反応させ、未反応の粒子は P B S で 3 回洗浄した後、蛍光プレートリーダー (M o l e c u l a r d e v i c e 社、S p e c t r a M a x G e m i n i E M) で e x t e n s i o n 4 8 4 n m 、e m i s s i o n 5 1 0 n m で抗ヒスチジントグ抗体に結合した G F P の蛍光を測定した。コントロールとして大腸菌から精製したヒスチジントグを持つ G F P タンパク質のみを同条件で測定した。測定結果コントロールの G F P のみを使った場合に比べて G F P 融合粒子は抗ヒスチジントグ抗体に非常に高感度に結合し蛍光を発することが確認された。

(実施例 3)

(S P R 法によるヒスチジントグのセンシング)

上記実施例 2 の抗ヒスチジントグ抗体 5 0 m g / m l 濃度を結合させた S P R 測定チップを日本レーザー電子社の N a n o s e n s o r に装着した後、上記実施例 C ~ E の要領で酵母から精製した G F P 粒子とコントロールのヒスチジントグを持つ G F P タンパク質を同時に流してニッケル基板上でのヒスチジントグのセンシング感度を測定した。結果は図で示すように同量のニッケルに対しての S P R によるヒスチジントグのセンシング感度はコントロールに比べて大幅に向上可能であることが確認された。なお、この結果は抗ヒスチジントグ抗体の代わりにアミノカップリング方によって S P R センサー上に結合させたニッケル錯体を使って行っても同様の結果が得られることを確認した。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

【図 1】この発明の実施例における H B s A g 遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1 ~ 8 は、表面抗原における各部位の働きを示している。

【図 2】この発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いた H B s A g 粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。(a) 遺伝子組換え酵母の作成、(b) H i g h - P i 培地における培養、(c) 8 S 5 N - P 4 0 0 培地における培養、(d) 破碎、(e) 密度勾配遠心分離、(f) H B s A g 粒子。

【図 3】この発明の実施例における H B s A g 粒子による S P R 信号増幅効果を表す。X 軸は反応時間 (s e c) を Y 軸は信号の大きさを表す。

【図 4】この発明の実施例における p G L D L I I P 3 9 - R c T G F P の作製法を表す概略模式図である。制限酵素 Not I 部位への H i s 6 - G F P 挿入部以外は図 1 に準ずる。

【符号の説明】

【 0 0 2 8 】

- 1 放出抑制
- 2 レセプター
- 3 糖鎖 1
- 4 血清重合アルブミンレセプター
- 5 膜貫通
- 6 安定化
- 7 糖鎖 2
- 8 膜貫通 低重合化・分泌

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 東レ株式会社

<120> 中空ナノ粒子を用いたバイオセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法

<130> 66M00220

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

cgacaaggca tgggaggcgg ccgcagccct caggctcag

39

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 2

ctgagcctga gggctgcggc cgcctcccat gccttgctg

39

<210> 3

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 3

agcggccgct caggttctca tcatcatcat catcatagtt ctggttcagt gagcaagggc

60

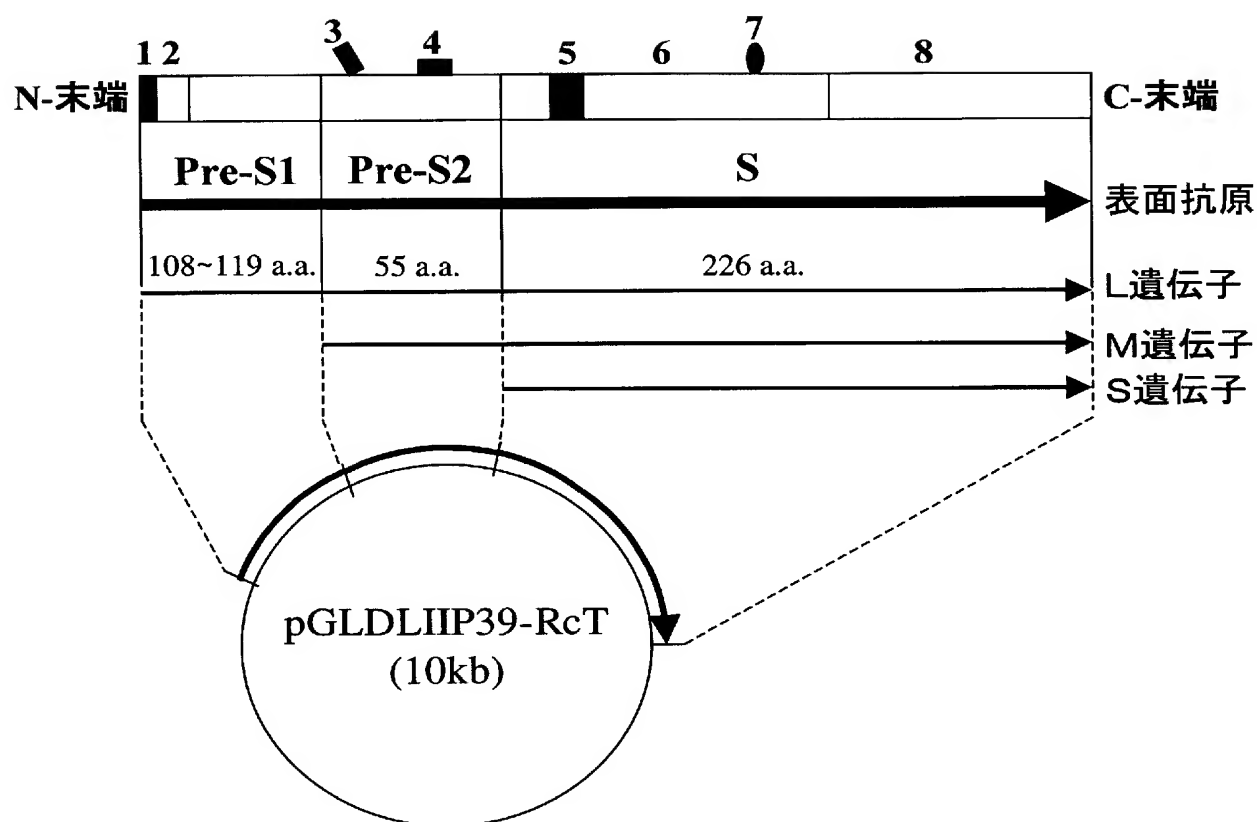
gaggga

65

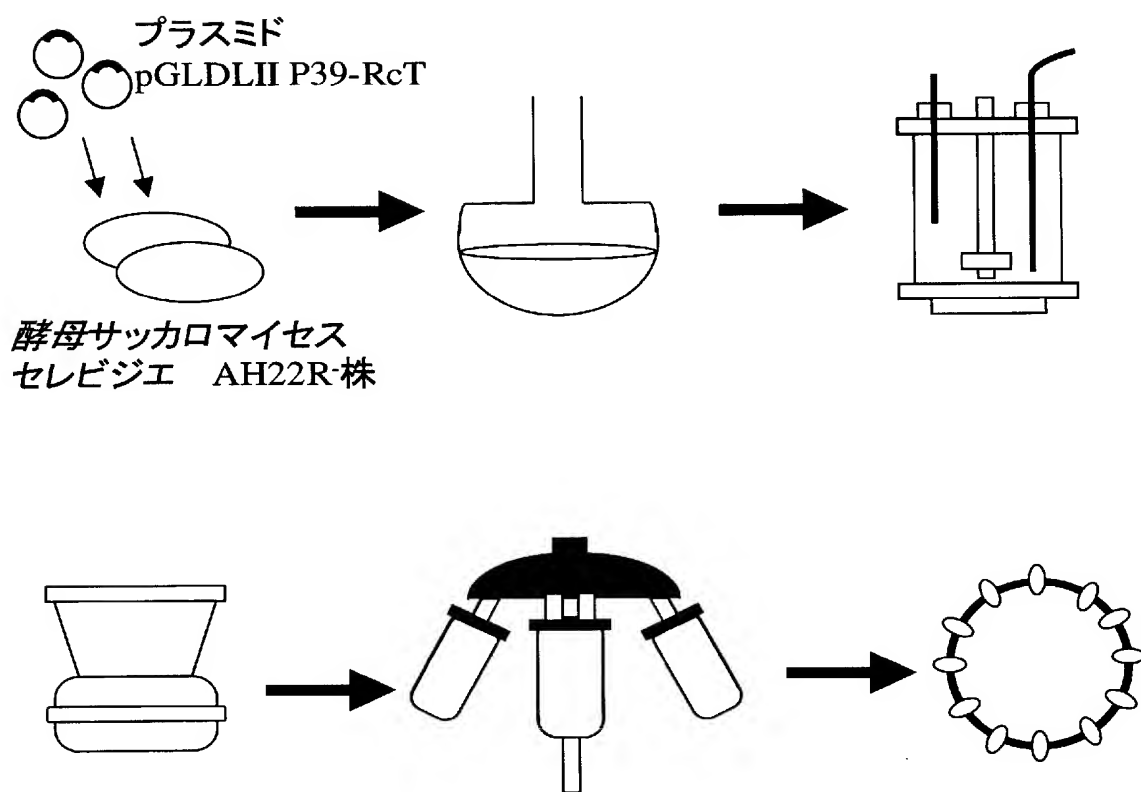
<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized Oligonucleotide

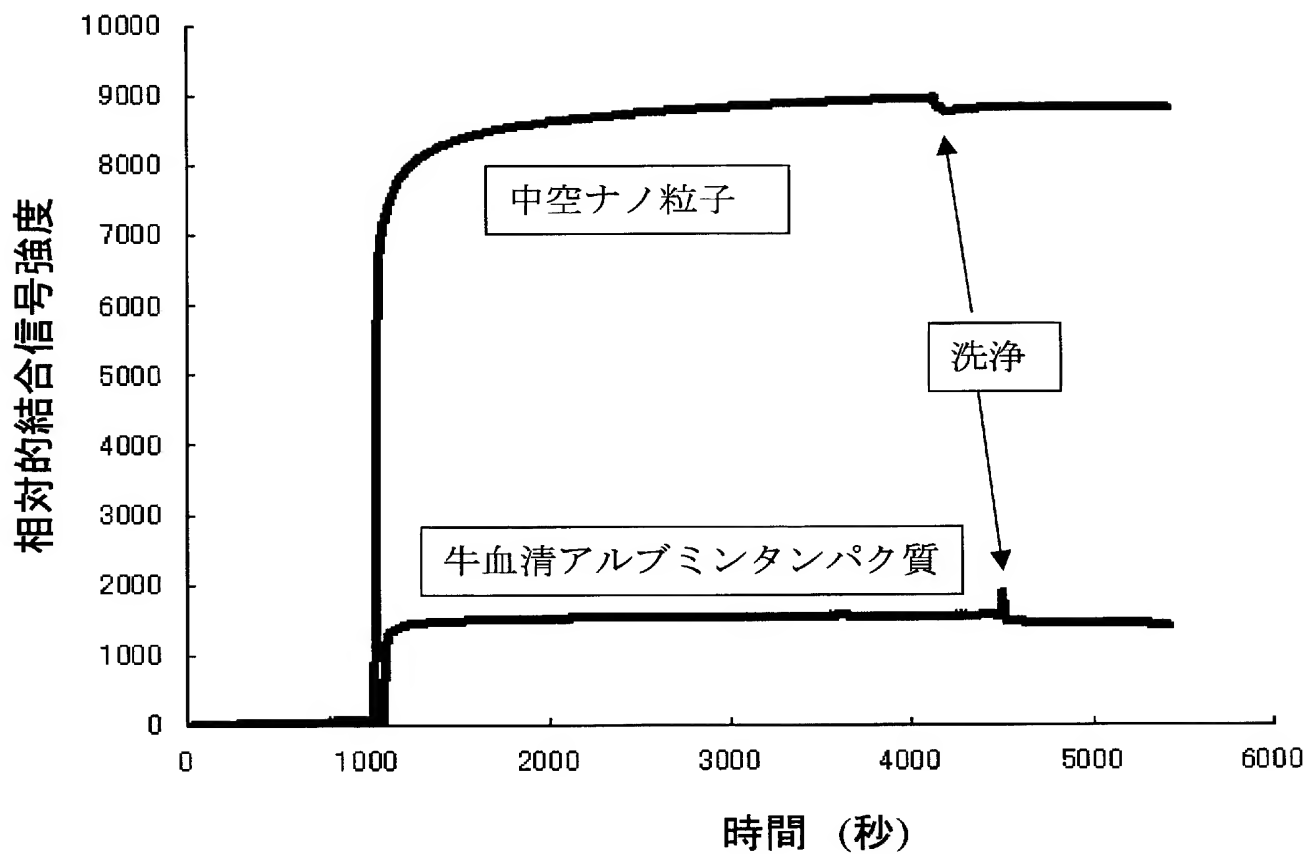
<400> 4
gcggccgctc ttgtacagct cgtccatg



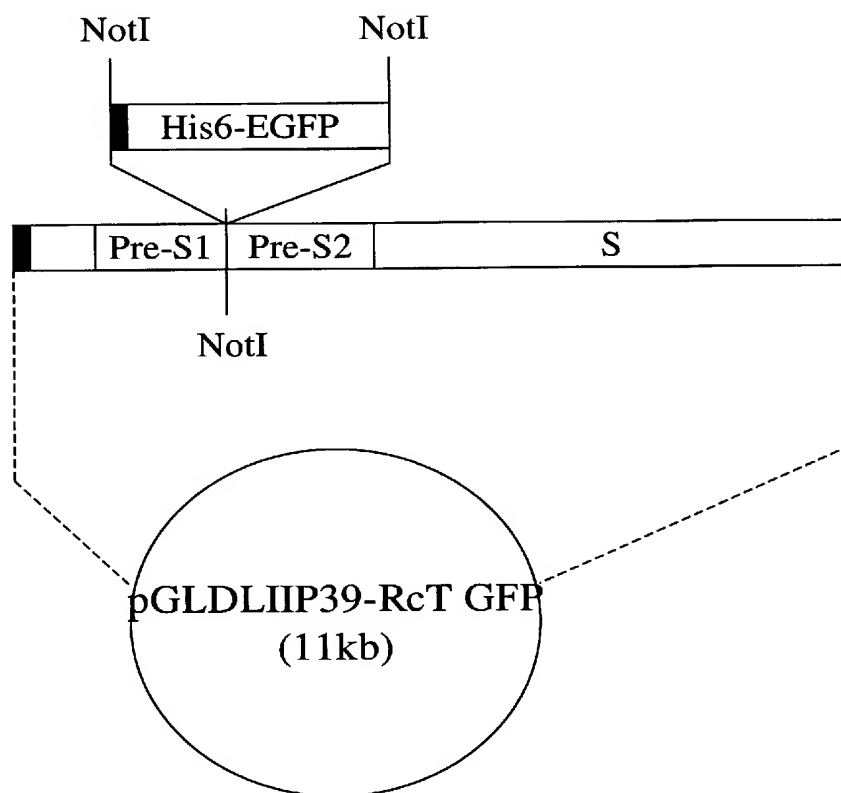
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 目的とする物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を高精度、かつ高感度にセンシングできる汎用的なツールおよびこれらを用いたセンシング方法を提供すること。

【解決手段】 脂質２重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に特定の物質認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 3 1 5 9

20021025

住所変更

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

東レ株式会社